

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE  
INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE  
PARIS

(11) N° de publication : 2 695 392

(à n'utiliser que pour les commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : 92 10609

(51) Int Cl<sup>s</sup> : C 07 K 7/10, 7/00, C 12 N 15/12, 15/63, 5/10, A 61 K 37/02, 7/00, A 01 H 5/00, A 23 L 3/352, A 01 N 37/44

(12)

## DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 04.09.92.

(30) Priorité :

(71) Demandeur(s) : CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) — FR.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 11.03.94 Bulletin 94/10.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : Se reporter à la fin du présent fascicule.

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(72) Inventeur(s) : Bulet Philippe, Hetru Charles et Hoffmann Jules.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : Cabinet Armengaud Ainé.

(54) Peptides possédant notamment des propriétés antibactériennes, leur procédé d'obtention, et leurs applications biologiques.

(57) L'invention concerne des peptides antibactériens tels que présents chez les paléoptères ou inducibles chez ces derniers par exemple par injection de bactéries ou traumatisme.

Ces peptides sont utilisables pour lutter contre les bactéries.

FR 2 695 392 - A1



5

PEPTIDES POSSEDANT NOTAMMENT DES PROPRIETES  
ANTIBACTERIENNES, LEUR PROCEDE D'OBTENTION, ET LEURS  
APPLICATIONS BIOLOGIQUES

L'invention a pour objet des peptides possédant notamment des propriétés antibactériennes, leur obtention,

10 ainsi que leurs applications biologiques.

Elle vise en particulier des peptides antibactériens du type de ceux inducibles chez des insectes.

On sait que certains insectes présentent une résistance efficace contre des bactéries. Des travaux récents ont établi que cette défense est pour une large part basée sur la synthèse rapide (2 à 6 h) de plusieurs familles de peptides ou de polypeptides. Cette synthèse peut être induite par une blessure septique, ou d'une manière générale, un traumatisme ou par immunisation, 20 c'est-à-dire par injection d'une faible dose de bactéries.

Parmi les peptides ou polypeptides produits, on peut distinguer les quatre groupes suivants :

i) les cécropines qui sont des peptides cationiques de 4 kDa formant deux hélices  $\alpha$  amphipathiques ; (ii) des peptides cationiques riches en proline, de petite taille (2 à 4 kDa), partiellement caractérisés comme les apidaecines et les abaecines ; (iii) plusieurs polypeptides distincts, ayant un poids moléculaire (PM) de 8 à 27 kDa, pour la plupart cationiques et fréquemment riches en résidus 30 glycine comme les attacines, les sarcotoxines II, les diptéricines et les coléoptéricines. Les peptides de ces trois groupes de molécules sont dépourvus de cystéine.

Un quatrième groupe de peptides antibactériens inducibles (iv) est constitué par les défensines 35 d'insectes.

Il s'agit de peptides non glycosylés, modérément cationiques avec un pI de 8,0 à 8,5, comprenant de 38 à 43 acides aminés et contenant un motif caractéristique de 6

résidus cystéine engagés dans 3 ponts disulfure intramoléculaires.

Les peptides de ces différents groupes ont pu être induits chez des lépidoptères, des diptères, des 5 hyménoptères et des coléoptères. Des travaux ultérieurs réalisés sur d'autres espèces comme les orthoptères et les dictyoptères n'ont pas permis en revanche de détecter la présence de tels peptides antibactériens.

Dans le cadre de leurs travaux sur l'étude des bases 10 moléculaires de la réponse immunitaire des insectes, les inventeurs ont isolé, chez *Phormia terranovae* (appelé ci-après *Phormia*), des peptides antibactériens de la famille 15 des défensines, qui présentent une activité contre les germes à Gram positif. Ces peptides font l'objet de la demande FR n° 2 633 296 déposée au nom du CNRS.

La mise au point d'un procédé de purification de ce type de peptides leur a permis d'isoler à partir d'autres insectes des produits de grand intérêt. Ils ont ainsi constaté que, d'une manière surprenante, il était possible 20 d'induire, chez une espèce particulière d'insectes, des peptides de plus large spectre antibactérien que celui observé avec les peptides extraits de *Phormia*, et d'activité plus élevée.

L'invention a donc pour but de fournir des peptides 25 ayant un haut niveau d'activité vis-à-vis d'un grand nombre de bactéries.

Elle a également pour but de fournir un procédé d'obtention de tels peptides.

L'invention vise en outre la mise à profit de leurs 30 propriétés antibactériennes pour l'élaboration de principes actifs utilisables en thérapeutique humaine et vétérinaire et d'une manière générale pour la lutte contre les bactéries.

Les peptides selon l'invention sont caractérisés en ce 35 qu'ils sont du type des peptides présents chez les paléoptères, plus spécialement chez les odonates, en particulier chez *Aeschna cyanea*, ou qu'ils sont inductibles chez ces derniers, notamment par injection de doses de

bactéries suffisantes pour provoquer leur synthèse, ou par traumatisme tel qu'une blessure septique, suivi d'une extraction de manière à récupérer les peptides antibactériens recherchés et, le cas échéant,  
5 fractionnement de l'extrait isolé afin de séparer les peptides selon le niveau de leur activité antibactérienne.

L'invention vise des peptides antibactériens tels qu'isolés à partir de l'hémolymphé des insectes, après induction de leur synthèse chez ces derniers.

10 De tels peptides sont plus spécialement inductibles chez les larves de ces insectes.

L'invention vise les extraits correspondants, les mélanges de peptides induits et les fractions.

15 Plus particulièrement, les peptides de l'invention sont caractérisés en ce que leur séquence en acides aminés, responsable de leur activité antibactérienne, est contenue dans un enchaînement d'acides aminés, différent de la séquence des défensines de diptères tels que *Phormia*, mais comportant comme ces dernières trois ponts disulfure  
20 reliant 6 résidus cystéine, respectivement le premier avec le quatrième, le deuxième avec le cinquième et le troisième avec le sixième, la position du deuxième et troisième ponts étant compatible avec la formation d'un motif de stabilisation d'une hélice alpha.

25 Les peptides de l'invention sont également caractérisés en ce que leur séquence en acides aminés, responsable de leur activité antibactérienne, est contenue dans un enchaînement comportant une structure tridimensionnelle, avec trois domaines correspondant  
30 successivement à une boucle N-terminale, une hélice  $\alpha$  et un feuillet  $\beta$  anti-parallèle C-terminal, l'hélice  $\alpha$  étant reliée au feuillet  $\beta$  anti-parallèle par deux ponts disulfure. La boucle N-terminale comporte avantageusement moins de 10 acides aminés, notamment environ 5 acides  
35 aminés.

L'enchaînement des acides aminés de la séquence biologiquement active, c'est-à-dire présentant au moins une activité antibactérienne, comporte, dans le coude du

feuillet  $\beta$ , au moins un motif proline. Ce coude comprend avantageusement environ 5 acides aminés.

Cet enchaînement est en outre caractérisé par la présence d'un motif hydrophobe tel que la thréonine dans la 5 liaison entre l'hélice  $\alpha$  et le feuillet  $\beta$  de la partie C-terminale. Cette liaison comporte avantageusement environ 5 acides aminés.

Les caractéristiques d'hydrophilie et d'hydrophobicité des acides aminés sont données par Kyte et Doolittle dans 10 J. Mol. Biol. 157, 105-132, 1982.

Les peptides de l'invention sont également caractérisés en ce qu'ils présentent une activité antibactérienne contre les germes à Gram positif et contre ceux à Gram négatif.

15 Des peptides antibactériens préférés répondent à l'analyse suivante :

Asx:1, Glx:3, Ser:2, Gly:6, His:2, Arg:3, Thr:4, Ala:0, Pro:2, Tyr:2, Val:0, Met:1, Cys:6, Ile:1, Leu:3, Phe:1, Lys:1, Trp:0.

20 L'invention vise également les fragments ou variantes de ces peptides définis ci-dessus, dès lors que ces fragments ou ces variantes sont reconnus par des anticorps dirigés contre lesdits peptides et/ou possèdent des caractéristiques de charge et/ou d'hydrophobicité ou 25 hydrophilie leur conférant une activité antibactérienne contre les germes à Gram positif et ceux à Gram négatif, telles qu'observées chez les peptides considérés. Par variantes, on entend les peptides dans lesquels un ou plusieurs acides aminés sont déletés, substitués, ou 30 remplacés par un autre acide aminé de charge voisine.

Une séquence peptidique préférée comprend ou est constituée par l'enchaînement suivant d'acides aminés :

NH<sub>2</sub>-Gly-Phe-Gly-Cys-Pro-Leu-Asp-Gln-Met-Gln-Cys-His-Arg-  
35 His-Cys-Gln-Thr-Ile-Thr-Gly-Arg-Ser-Gly-Gly-Tyr-Cys-Ser-Gly-Pro-Leu-Lys-Leu-Thr-Cys-Thr-Cys-Tyr-Arg-COOH,

Selon un autre aspect, l'invention vise les séquences de nucléotides comportant l'information génétique correspondant aux acides aminés des peptides définis ci-dessus.

5 Elle vise également les séquences de nucléotides capables de s'hybrider dans des conditions stringentes avec les séquences ci-dessus.

Par conditions stringentes, on entend des conditions définies dans "Molecular Cloning" 1989 par Sambrook, 10 Fritsch et Maniatis, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Les séquences de nucléotides complémentaires de celles définies plus haut ainsi que les ARN correspondants entrent également dans le cadre de l'invention.

15 Les vecteurs d'expression et/ou de clonage comportant au moins un fragment des séquences de nucléotides définies ci-dessus font également partie de l'invention, ainsi que les hôtes transformés par ces vecteurs.

A titre d'exemples, des hôtes appropriés pour la mise en oeuvre de l'invention comprennent des bactéries, par 20 exemple E.coli, des levures ou encore des cellules d'arthropodes, de plantes ou de vertébrés.

L'invention concerne également les produits d'expression des vecteurs ci-dessus.

25 Les propriétés antibactériennes des peptides de l'invention sont avantageusement mises à profit conformément à l'invention en thérapeutique humaine ou animale, ou pour traiter un environnement donné.

30 L'invention vise donc des agents ou compositions antibactériennes renfermant une quantité efficace des peptides définis ci-dessus en association avec un véhicule inerte approprié pour l'application envisagée.

Il est avantageux d'incorporer des excipients tels qu'inhibiteurs de protéases, antioxydant et inhibiteur de multiplication des bactéries.

35 Les compositions ou agents destinés à la thérapeutique humaine se présenteront avantageusement sous une forme pour usage externe, telle que pommades, crèmes, poudres, ou solutions.

Les posologies correspondent à celles utilisées communément dans ces domaines.

Ces compositions sont particulièrement indiquées pour le traitement des yeux, des oreilles, des soins buccaux et 5 dentaires et en gynécologie.

Elles présentent également un grand intérêt chez l'animal, et permettent de traiter notamment des mammites.

Les compositions de l'invention présentent également un grand intérêt en agrochimie pour l'élaboration de 10 produits phytosanitaires. Elles sont avantageusement utilisées sous forme de poudre ou de solutions d'épandage.

L'utilisation des compositions et agents antibactériens de l'invention dans l'industrie agro-alimentaire permet d'empêcher la contamination par des 15 germes à Gram négatif et des germes à Gram positif, pendant la fabrication de produits et leur conservation.

L'invention vise également les génomes des plantes tels que modifiés par l'introduction de gènes codant pour les peptides antibactériens définis ci-dessus. On dispose 20 ainsi de plantes résistant à des agents pathogènes.

La caractérisation de la séquence en acides aminés des peptides de l'invention fournit les données de structure pour leur élaboration.

En opérant par voie de synthèse, ces structures sont 25 aisément accessibles en utilisant les synthétiseurs classiques de la chimie des peptides.

Selon une variante, ces peptides peuvent être obtenus en mettant en oeuvre les techniques du génie génétique, en introduisant dans un vecteur approprié les séquences de 30 nucléotides capables d'exprimer le squelette peptidique chez un hôte recherché.

Selon encore une autre variante, ces peptides sont obtenus en immunisant des paléoptères renfermant des gènes capables de coder pour le ou les glycopeptide(s) 35 recherché(s), par injection par exemple de bactéries, en quantité suffisante pour provoquer leur synthèse, ou par traumatisme, tel qu'une blessure septique. Quelques heures après l'immunisation, ou le traumatisme, les peptides sont

extraits puis fractionnés et les fractions correspondant au(x) peptide(s) recherché(s) isolée(s).

L'extraction est réalisée dans des conditions permettant d'éviter tout phénomène de dégradation des 5 glycopeptides, tel qu'oxydation ou action de protéases.

Pour la purification des produits, on utilise avec avantage des supports très peu rétensifs et possédant un pouvoir séparateur élevé. Des supports appropriés sont choisis parmi les supports utilisés en phase inverse.

10 La mise en oeuvre de ces dispositions permet d'isoler les peptides antibactériens sous une forme de grande pureté.

15 L'invention sera décrite ci-après de manière plus détaillée dans les exemples de synthèse de peptides de l'invention donnés à titre illustratif.

Dans ces exemples, il est fait référence aux figures 1 à 5 qui représentent respectivement, les figures 1 à 3, la courbe d'élution d'un peptide de l'invention, avec mesure de l'absorbance en fonction du temps pour plusieurs étapes 20 du procédé de purification,

- la figure 4, une comparaison des séquences du peptide selon l'invention et d'un peptide induit chez Phormia, et

25 - la figure 5 la structure tridimensionnelle de la défensine induite chez Phormia, avec indication, en rapport avec cette structure, des séquences de peptides de Phormia et d'un peptide de l'invention.

Les activités biologiques rapportées dans ces exemples sont mesurées comme suit :

30 Préparation des souches bactériennes pour le test antibactérien en milieu solide.

Le test biologique permettant de suivre les molécules actives tout au long de leur purification est réalisé en routine sur les souches E.coli D31 (Gram négatif) et M. 35 luteus (Gram positif).

Ces souches sont conservées à -80°C dans un milieu LB additionné de glycérol. Une fraction aliquote de milieu contenant les souches bactériennes est étalée sur milieu LB

gélosé. Après incubation à 37°C, une colonie isolée est prélevée, puis placée dans 10 ml de milieu LB liquide mis sous agitation à 37°C pendant une nuit. La suspension bactérienne obtenue (1 ml) est repiquée dans 5 ml de milieu LB frais, et remise en agitation, à 37°C. Lorsque les bactéries sont en phase exponentielle de croissance, elles sont ramenées, par dilution dans du milieu LB frais, à une concentration de 50 000 UFC/ml, puis mélangées à du milieu LB gélosé préalablement fondu et maintenu à 48°C. Ce mélange (7,5 ml) est coulé dans des boîtes de Petri, qui peuvent ainsi être conservées plusieurs jours au réfrigérateur.

\*Test antibactérien en milieu solide.

L'échantillon à tester (2 µl) est déposé dans des puits de 2 mm de diamètre creusés à l'aide d'un emporte-pièces dans la gélose des boîtes préparées selon le modèle décrit ci-dessus. Après une nuit d'incubation à 37°C, les activités antibactériennes sont repérées par la présence de cercles d'inhibition de croissance des bactéries. Les diamètres de ces cercles présentent un certain degré de proportionnalité par rapport à la quantité ou à l'activité du principe actif déposé dans le puits.

\*Réalisation du test bactéricide en milieu liquide.

L'échantillon à tester (10 µl) est déposé dans des puits de plaques de microtitration dans lesquels sont ajoutés 100 µl d'une culture bactérienne en phase exponentielle de croissance ramenée à D<sub>0600</sub> = 0,001. Après 24 heures d'incubation à 25°C, la croissance bactérienne est mesurée à 600 nm. L'inhibition de croissance des bactéries, qui reflète l'activité antibactérienne, est mise en évidence par la différence de D<sub>0600</sub> existant entre les fractions testées et une culture témoin dans laquelle les 10 µl d'échantillon sont remplacés par 10 µl d'eau stérile.

Exemple 1 : Synthèse biologique d'un peptide selon l'invention.

On injecte des bactéries à des larves de *Aeschna cyanea*, puis on extrait et purifie le peptide produit en 5 opérant selon le protocole suivant :

**1/ Induction du peptide**

\* Des larves de l'avant dernier et du dernier stade, de 500 mg à 1 g environ, reçoivent chacune une injection de 10 10 µl contenant 5 000 germes de *Enterobacter cloacae*.

**2/ Extraction**

\* L'hémolymphe (4 ml) est prélevée à partir de 100 larves ainsi immunisées, par une incision dans l'abdomen. Le sang recueilli est collecté dans des tubes maintenus à 15 0°C, contenant de l'aprotininine (concentration finale en aprotininine 10 µg/ml). Les cellules sanguines sont éliminées par une centrifugation à 15 000 g pendant 1 h à 4°C. La fraction plasmatique est ensuite purifiée à l'aide de séparateurs tels qu'utilisés en phase inverse sous forme de 20 cartouches comme commercialisé par Millipore sous la marque Sep-Pak C18 R.

**3/ Purification par HPLC**

**a) première étape**

La fraction "Elution 60 %", qui contient une forte 25 activité antibactérienne contre *M. luteus*, est analysée sur une colonne de phase inverse Aquapore OD 300 C18 avec un gradient linéaire d'acétonitrile de 10 à 60 % dans l'eau acidifiée (ATF 0,05 %) en 90 minutes (soit une augmentation de 0,56 % d'acétonitrile par minute) pour un débit de 1 30 ml/min.

La collecte des fractions est réalisée suivant la variation de l'absorption à 225 nm, en tenant compte des épaulements. Chaque fraction ainsi récoltée est attribuable à un pic de densité optique.

35 Sur la figure 1, on a représenté la variation de l'absorbance (D0225nm) en fonction du temps. La ligne en pointillés représente le gradient linéaire d'acétonitrile et la courbe en trait plein l'absorbance.

Toutes les fractions sont évaporées à sec sous vide et reconstituées dans de l'eau MilliQ<sup>R</sup>. L'activité antibactérienne de chaque fraction est détectée par la technique du test d'inhibition de croissance en milieu solide décrit ci-après. Les mesures obtenues contre M.luteus sont indiquées dans les colonnes en pointillés.

5           **b) Deuxième étape**

La fraction présentant l'activité antibactérienne est analysée sur une colonne de tamisage moléculaire SEC 3000R (Beckman) en condition isocratique avec comme éluant un tampon 50 mM d'acétate de sodium à pH 4, contenant 0.3 M en NaCl, à un débit de 0,5 ml/min. La mesure de l'absorbance des fractions éluées en fonction du temps est rapportée sur la figure 2. L'activité antibactérienne de chaque fraction contre M.luteus est indiquée dans les colonnes.

10           **c) Purification finale**

La fraction qui présente l'activité biologique est purifiée sur une colonne de phase inverse Aquapore RP 300 C<sub>8</sub>R (Brownlee Associates). L'élution est réalisée dans un gradient linéaire d'acétonitrile de 10 à 60 % dans l'eau acidifiée avec de l'acide heptafluorobutyrique (ou AHFB) 0,1 %, en 120 minutes (soit une progression de 0,42 % d'acétonitrile par minute) pour un débit de 1 ml/min.

15           La figure 3 donne la variation de l'absorbance en fonction du temps et indique l'activité antibactérienne des fractions.

20           **Réduction et alkylation**

Une fraction aliquote du peptide purifié est dissoute dans 40 µl de Tris-HCl 0,5 M, d'EDTA 2 mM, pH 7,5 contenant 30 du chlorhydrate de guanidine 6 M auquel on ajoute 2 µl de 2,2 M de dithiothréitol. On ajoute ensuite de la 4-vinylpyridine (µl) fraîchement distillée et on laisse incuber le mélange 10 min à 45°C à l'obscurité. Le peptide pyridyléthylé obtenu est séparé par HPLC en phase inverse 35 avant le microséquençage.

L'analyse de la microséquence est réalisée en procédant à une dégradation d'Edman automatisée du peptide réduit et alkylé et à la détection des dérivés de

phénylthiohydantoine sur un séquenceur automatique à liquide pulsé (Applied Biosystems) modèle 473 A ou 477 A.

L'analyse des acides aminés est effectuée sur un analyseur 420 A (Applied Biosystems) avec analyseur HPLC et microordinateur.

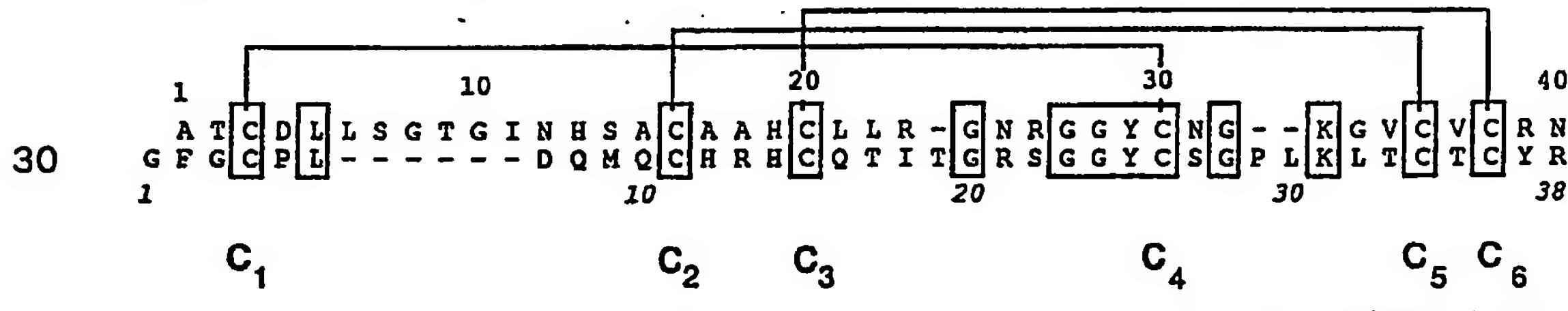
Le peptide est hydrolysé à 120°C durant 24 heures avec HCl 6N en phase gazeuse (Pico-Tag, Millipore). On forme des dérivés avec le phényl isothiocyanate, puis on détecte les acides aminés à 254 nm.

Le peptide isolé et purifié présente la séquence en acides aminés donnée plus haut, à savoir  
 NH<sub>2</sub>-Gly-Phe-Gly-Cys-Pro-Leu-Asp-Gln-Met-Gln-Cys-His-Arg-His-Cys-Gln-Thr-Ile-Thr-Gly-Arg-Ser-Gly-Gly-Tyr-Cys-Ser-Gly-Pro-Leu-Lys-Leu-Thr-Cys-Thr-Cys-Tyr-Arg-COOH,

L'analyse par spectrométrie de masse conduit à une masse molaire de 4173,4. La masse isotopique moyenne calculée à partir des données de la séquence, en considérant que 6 résidus cystéine sont engagés dans 3 ponts disulfure intramoléculaires est de 4173,8.

Pour faciliter la comparaison avec la défensine de Phormia qui correspond à la défensine la mieux caractérisée à ce jour, on a représenté sur la figure 5 leurs séquences peptidiques en introduisant des discontinuités, indiquées par des tirets, pour optimiser l'alignement des séquences.

La première séquence correspond à celle du peptide induit chez Phormia et la deuxième séquence au peptide induit chez Aeschna cyanea.



De manière conventionnelle, les lettres utilisées dans ces séquences ont les significations suivantes.

A = Ala ; R = Arg ; D = Asp ; N = Asn ; C = Cys ; Q = Gln ; E = Glu ; G = Gly ; H = His ; I = Ile ; L = Leu ; K = Lys ; M = Met ; F = Phe ; P = Pro ; S = Ser ; T = Thr ; W = Trp ; Y = Tyr ; V = Val.

Les encadrements mettent en évidence la position des acides aminés identiques entre les séquences.

5 Comme indiqué plus haut, les six résidus cystéine des peptides désignés par C1 à C6 sont reliés entre eux sous forme de pont disulfure de manière identique.

Sur la figure unique, on a représenté la structure tridimensionnelle de la défensine de Phormia et en rapport avec cette structure les deux séquences ci-dessus.

On constate que

10 \* le coude dans le feuillet  $\beta$  qui est situé au niveau des résidus glycine-32-lysine-33-glycine-34 dans la défensine de Phormia est, dans la défensine d'Aeschna, agrandi par la présence de deux résidus supplémentaires, une proline et une leucine.

15 \* De plus, dans la défensine d'Aeschna la liaison entre l'hélice  $\alpha$  et le feuillet  $\beta$  C-terminal est allongée par un acide aminé supplémentaire : une thréonine.

20 Une différence supplémentaire peut aussi être observée entre ces deux molécules : trois doublets hydrophobes sont présents dans la défensine de Phormia (leucine 5-leucine 6 ; leucine 21-leucine 22 ; valine 35-valine 37), et semblent jouer un rôle dans la structuration de la molécule ; ces domaines sont absents ou remplacés dans la défensine d'Aeschna par des acides aminés hydrophiles 25 (thréonine 33-thréonine 35 au lieu de valine 35-valine 37).

Etude de l'activité antibactérienne du peptide induit chez Aeschna cyanea.

30 On rapporte dans le tableau qui suit les résultats obtenus en procédant aux tests d'inhibition de croissance réalisés contre diverses souches bactériennes à l'aide du peptide induit chez Aeschna cyanea et à titre de comparaison chez Phormia.

---

---

Peptide déposé	Souche bactérienne	Aeschna				Phormia				Aeschna				Phormia			
		10 pmol	5 pmol	2 pmol	1 pmol	10 pmol	5 pmol	2 pmol	1 pmol	10 pmol	5 pmol	2 pmol	1 pmol	10 pmol	5 pmol	2 pmol	1 pmol
<b>Germe à Gram-positif</b>																	
<i>M.</i>	<i>luteus</i>	10	8.5	8	7	5.5	4.5	4.5	3	2.5							
<i>A.</i>	<i>viridans</i>	1.5	1.1	1.3	9	11	6	9	0								
<i>P.</i>	<i>acidilactici</i>	8	3	5	0	3	0	0	0								
<i>B.</i>	<i>megaterium</i>	8	5	7	5	5.5	4	3.5	3								
<i>S.</i>	<i>pyogenes</i>	6	3	5	0	4	0	0	0								
<b>Germe à Gram-négatif</b>																	
<i>A.</i>	<i>faecalis</i>	4	0	3	0	3	0	0	0								

L'examen de ce tableau montre que le peptide de l'invention est plus actif que celui induit chez Phormia et qu'il présente, contrairement à ce dernier, une activité contre des germes à Gram négatif.

On constate donc que le peptide de l'invention présente un spectre d'activité plus large que celui du peptide induit chez Phormia.

L'étude du mode d'action de ce peptide a été vérifiée comme suit.

On a ajouté, à 90 µl d'une culture de *M. luteus* en phase de croissance exponentielle, respectivement 10 et 100 pmoles du peptide induit chez *Aeschna* (concentration finale 0,1 et 1 µM respectivement), ou de l'eau distillée (témoin) au temps 0. Des fractions aliquotes ont été prélevées à différents intervalles de temps et sont étalées sur de l'agar pour déterminer le nombre de colonies formées (UFC = unités formant des colonies) après une incubation d'une nuit à 37°C.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 2 ci-après.

	temps (h)	UFC x 10 <sup>6</sup> /ml		
		100 pmol	10 pmol	Témoin
	0	44	41	42
	0,5	51	50	50
	3	19	34	56
30	8	0	10	78
	24	0	0	85

On constate donc qu'après une incubation de 24 heures, aucune colonie de bactéries n'est formée, mettant en évidence l'activité bactéricide du peptide.

Exemple 2 : Synthèse du peptide de l'exemple 1 par voie chimique.

On procède à l'enchaînement souhaité des acides aminés  
5 à l'aide d'un synthétiseur de peptides tel que celui commercialisé sous la marque Milligen 9000 par Millipore.

On vérifie que le peptide recherché a bien été synthétisé en opérant une dégradation d'Edman et en mesurant la masse molaire par spectrométrie de masse.

10

Exemple 3 : Synthèse du peptide de l'exemple 1 par génie génétique.

On introduit l'ADNC ou le gène synthétique capable de coder pour le peptide recherché dans un plasmide navette E.coli levure avec une cassette d'expression des facteurs MF dans *Saccharomyces cerevisiae*. Le peptide exprimé est recueilli selon les techniques habituelles et sa séquence vérifiée.

20

Exemple 4 : Formulation pour le traitement de mammites:

peptide de l'exemple 1 :	10 à 100 mg
excipient :	1 g

On applique la pommade à raison de 4 fois par jour pendant une semaine.

## REVENDICATIONS

1/ Peptides antibactériens, caractérisés en ce qu'ils sont du type des peptides présents chez les paléoptères, plus spécialement chez les odonates, en particulier chez Aeschna cyanea, ou qu'ils sont inductibles chez ces derniers notamment par injection de doses de bactéries suffisantes pour provoquer leur synthèse, ou par traumatisme tel que blessure septique, extraction de manière à récupérer les peptides antibactériens recherchés et, le cas échéant, fractionnement de l'extrait isolé afin de séparer les peptides selon le niveau de leur activité antibactérienne.

2/ Peptides antibactériens, caractérisés en ce qu'ils sont isolés à partir de l'hémolymphe des insectes selon la revendication 1, après induction de leur synthèse chez ces derniers.

3/ Peptides selon la revendication 1 ou 2, caractérisés en ce qu'ils sont inductibles chez les larves desdits insectes.

4/ Peptides selon la revendication 1, 2 ou 3, caractérisés en ce que leur séquence en acides aminés, responsable de leur activité antibactérienne, est contenue dans un enchaînement d'acides aminés, différent de la séquence des défensines de diptères tels que Phormia, mais comportant comme ces dernières trois ponts disulfures reliant 6 résidus cystéine, respectivement le premier avec le quatrième, le deuxième avec le cinquième et le troisième avec le sixième, la position du deuxième et troisième pont disulfure étant compatible avec la formation d'un motif de stabilisation d'une hélice alpha.

5/ Peptides selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisés en ce que leur séquence en acides aminés, responsable de leur activité antibactérienne, est contenue dans un enchaînement présentant une structure tridimensionnelle comportant trois domaines correspondant successivement à une hélice  $\alpha$  et un feuillet  $\beta$  anti-

parallèle C-terminal, l'hélice  $\alpha$  étant reliée au feuillet  $\beta$  anti-parallèle par deux ponts disulfure.

5        6/ Peptides selon la revendication 5, caractérisés en ce que la boucle N-terminale comporte moins de 10 acides aminés, notamment environ 5 acides aminés.

10      7/ Peptides selon la revendication 6, caractérisés en ce que l'enchaînement d'acides aminés de la séquence biologiquement active comporte, dans le coude du feuillet  $\beta$ , un résidu proline, ce coude comprenant avantageusement environ 5 acides aminés.

15      8/ Peptides selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisés en ce qu'ils présentent une activité antibactérienne contre les germes à Gram positif ainsi que contre les germes à Gram négatif.

19      9/ Les fragments et variantes des peptides selon l'une des revendications 1 à 8.

20      10/ Peptide antibactérien caractérisé en ce qu'il comprend ou qu'il est constitué par l'enchaînement suivant en acides aminés

25      NH<sub>2</sub>-Gly-Phe-Gly-Cys-Pro-Leu-Asp-Gln-Met-Gln-Cys-His-Arg-His-Cys-Gln-Thr-Ile-Thr-Gly-Arg-Ser-Gly-Gly-Tyr-Cys-Ser-Gly-Pro-Leu-Lys-Leu-Thr-Cys-Thr-Cys-Tyr-Arg-CO-OH,

30      11/ Séquences de nucléotides comportant l'information génétique correspondant aux acides aminés des peptides selon l'une des revendications 1 à 10, les séquences capables de s'hybrider dans des conditions stringentes avec lesdites séquences de nucléotides, et les séquences complémentaires et ARN correspondants.

35      12/ Vecteurs d'expression et/ou de clonage comprenant au moins un fragment des séquences de nucléotides selon la revendication 11 et hôtes transformés par ces vecteurs.

36      13/ Compositions antibactériennes, caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace des peptides selon l'une des revendications 1 à 10, en association avec un véhicule approprié pour une application donnée.

37      14/ Compositions antibactériennes selon la revendication 13, caractérisées en ce qu'elles se

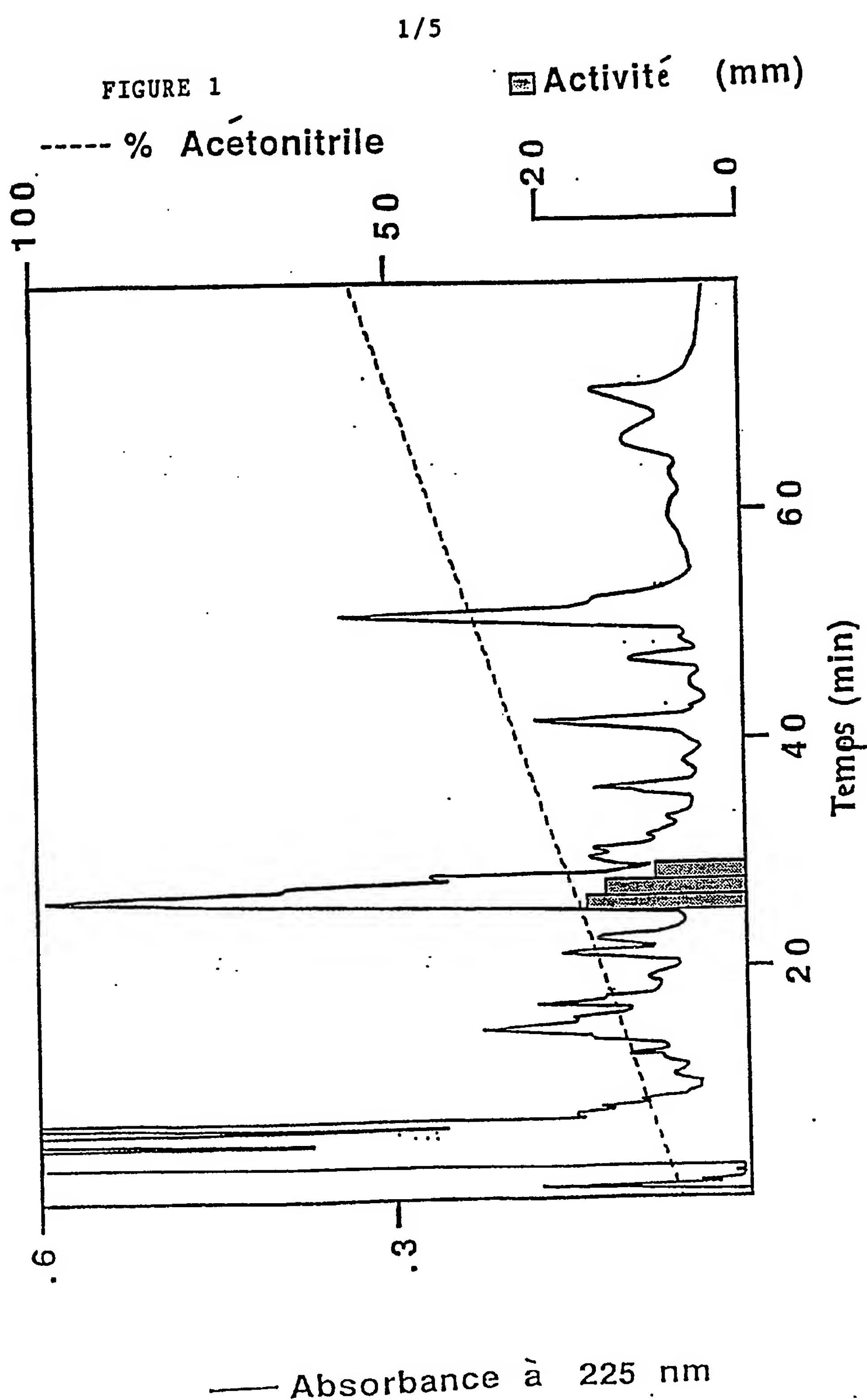
présentent sous une forme pour usage externe telle que pommades, crèmes, poudres ou solutions.

15/ Utilisation de compositions selon la revendication 13 dans le domaine agro-alimentaire et en agrochimie.

5 16/ Compositions selon l'une des revendications 13 ou 14, caractérisées en ce qu'elles sont destinées au traitement des yeux, des oreilles, aux soins buccaux et dentaires et en gynécologie.

10 17/ Cellules végétales et plantes dont le génome est modifié par la présence de gènes capables de coder pour les séquences peptidiques des peptides selon l'une des revendications 1 à 10.

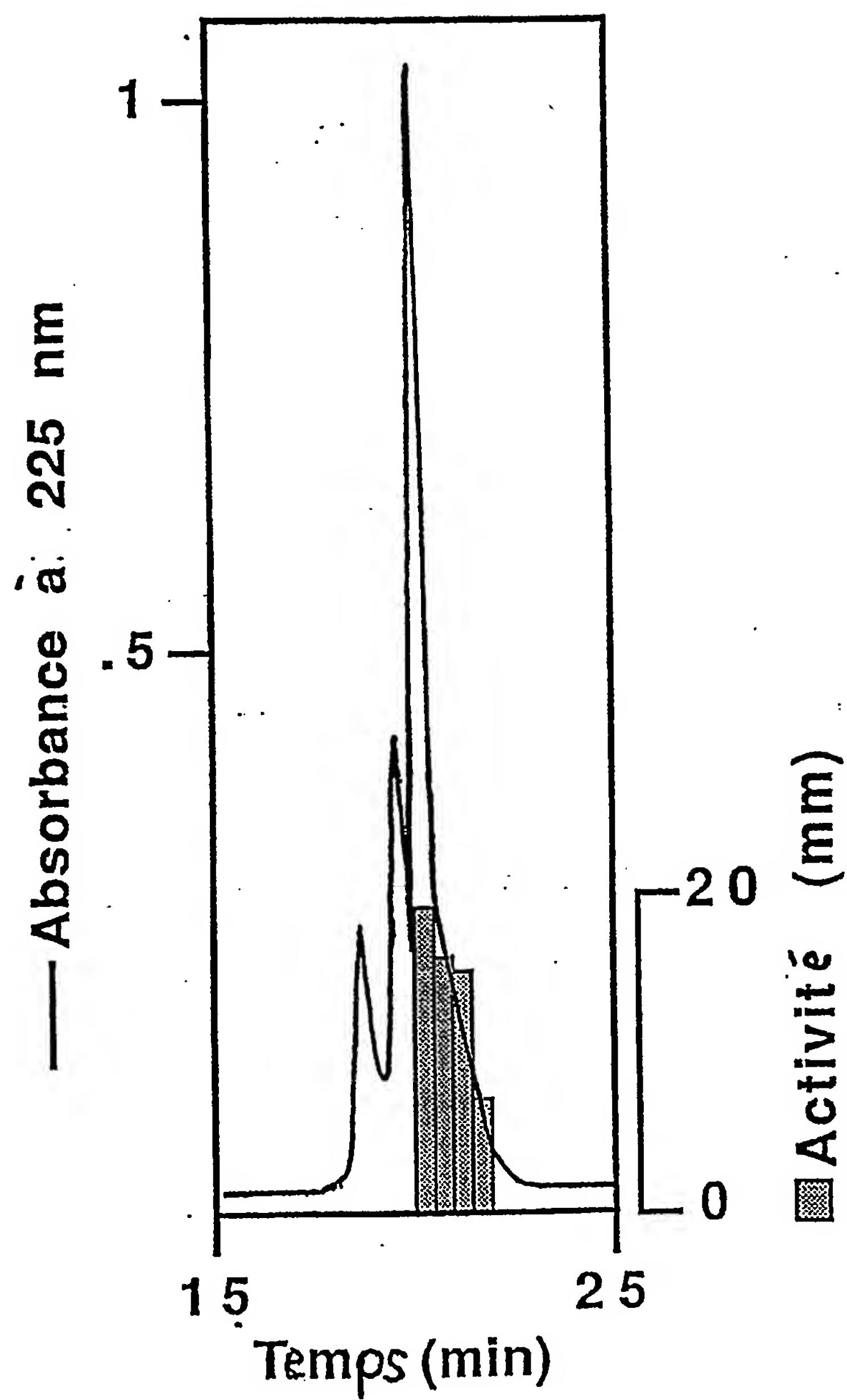
2695392



2695392

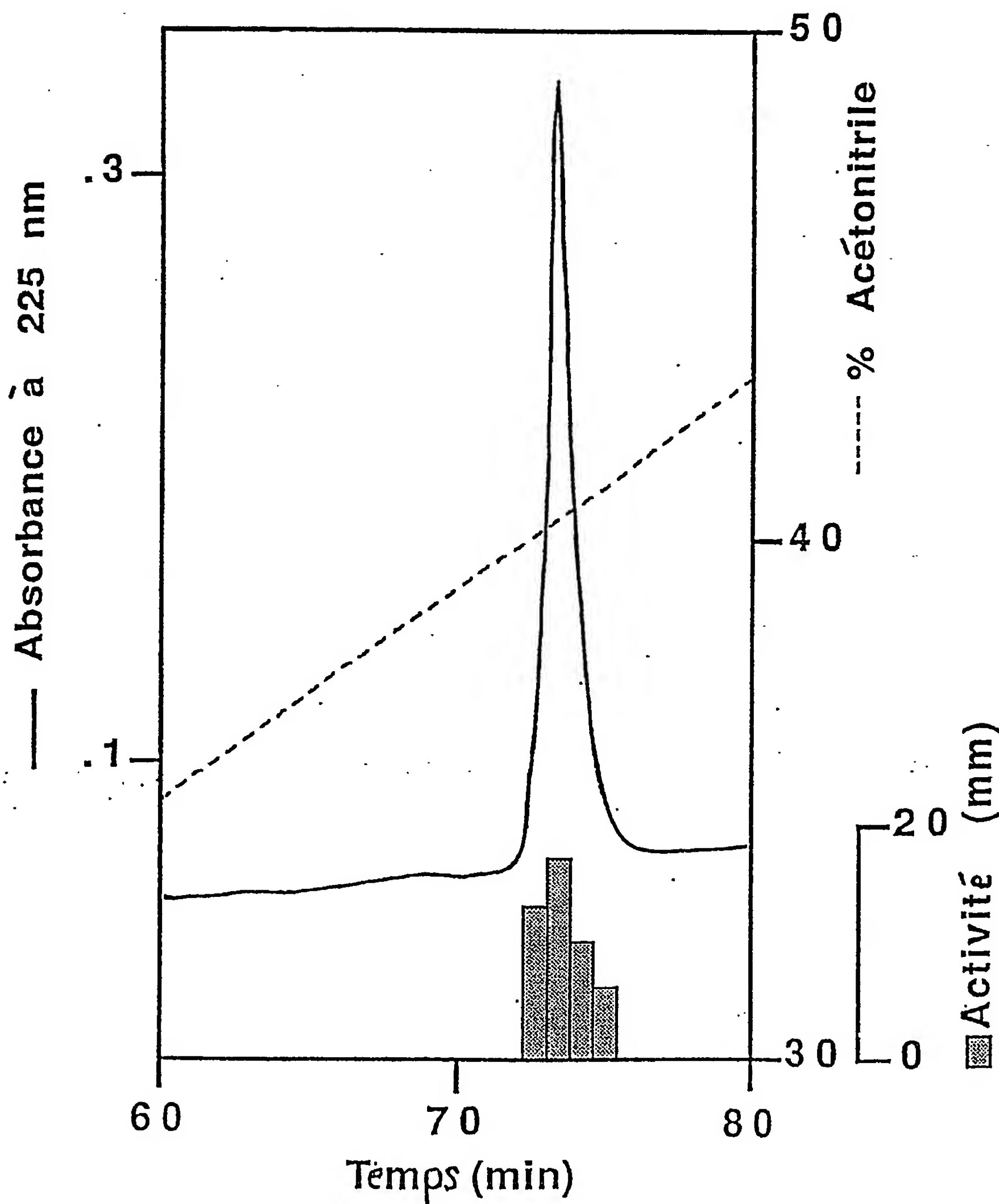
2/5

FIGURE 2



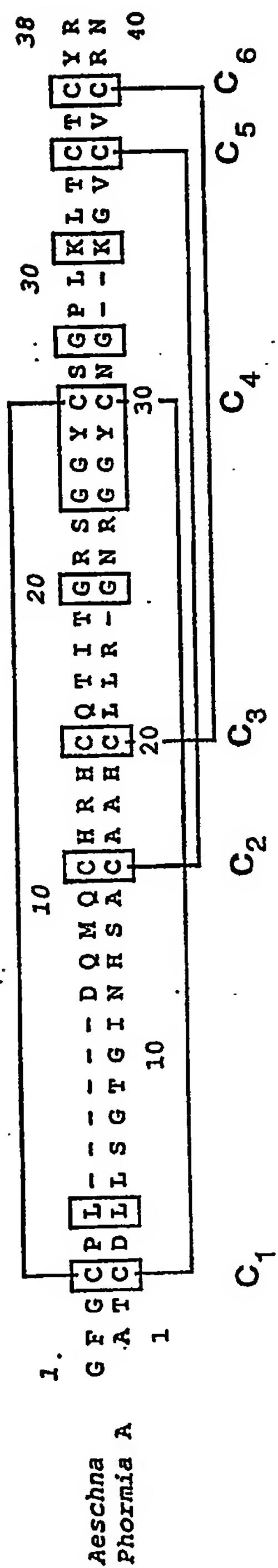
3/5

FIGURE 3



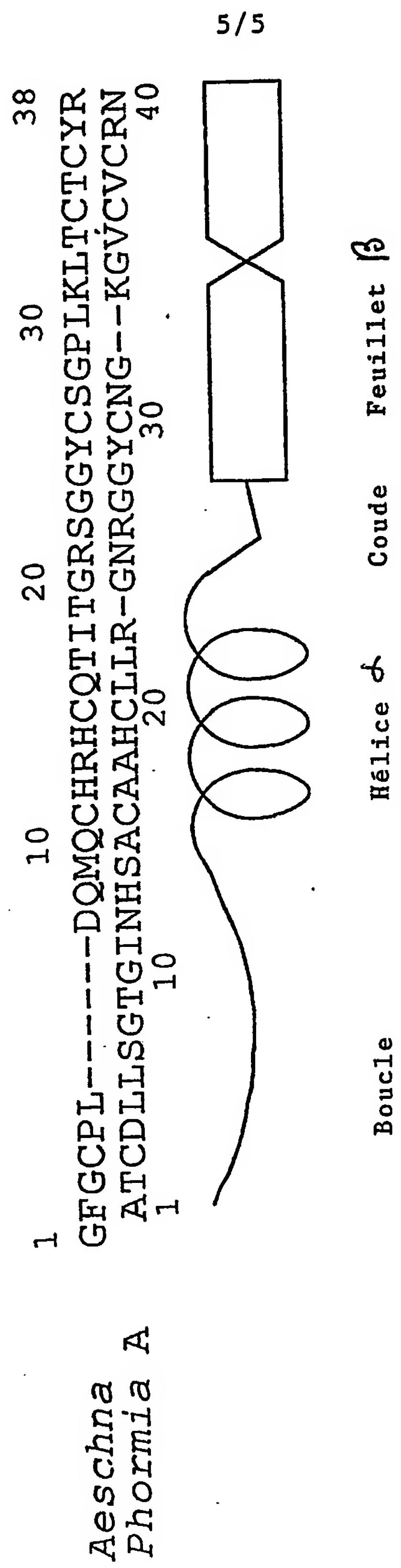
4/5

FIGURE 4



2695392

FIGURE 5



REPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
de la  
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

2695392

N° d'enregistrement  
national

FR 9210609  
FA 476188

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
T	<p>EUR. J. BIOCHEM. vol. 209, no. 3, Novembre 1992, pages 977 - 984</p> <p>BULET, P., ET AL. 'A novel insect defensin mediates the inducible antibacterial activity in the larvae of the dragonfly Aeschna cyanea (Paleoptera, Odonata)' * le document en entier *</p> <p>-----</p>	1-14, 16
		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl. 5)
		C07K A01N
1		
EPO FORM 1503 OCT 92 (P0013)	Date d'achèvement de la recherche 25 MAI 1993	Examinateur MADDOX A.D.
<b>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</b>	<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention      E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure.      D : cité dans la demande      L : cité pour d'autres raisons      .....      &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		

BEST AVAILABLE COPY